

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-289898

(43)Date of publication of application : 19.12.1986

(51)Int.Cl.

C12P 21/04  
A01N 63/02  
C07K 7/06  
// (C12P 21/04  
C12R 1:125 )  
C07K 99:00

(21)Application number : 60-130338

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 14.06.1985

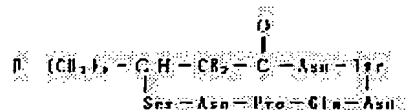
(72)Inventor : HATADA KIYOTAKA  
ASANO TAKASHI  
ITO SHOTA  
SAITO ISAO  
GOTO TOMIO  
IKUSHIMA YUTAKA  
IKUI TSUNEO

## (54) PRODUCTION OF FACTOR FOR SUPPRESSING SPORULATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGUS

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To produce a factor for suppressing the sporulation of phytopathogenic fungus and effective for the prevention and remedy of plant blights, in high yield in a short time, by culturing a specific *Bacillus* genus strain aerobically in a nutrient medium.

**CONSTITUTION:** *Bacillus subtilis* No.NA-apb-1 strain which is an aerobic Grampositive bacterium separated from the leaf of rice plant and having motility with lateral flagella and characteristic features such as decomposition of hippuric acid salt, growth temperature, utility of carbon source, etc., is inoculated in a medium composed of a carbon source (e.g. sucrose), nitrogen source (e.g. meat extract), NaCl, etc., and cultured under aeration at 20W30° C to effect the production and accumulation of iturin A of formula (R is alkyl) (a factor for suppressing the sporulation of phytopathogenic fungus). The accumulated substance is separated and purified by centrifugal separation, extraction, resin treatment, freeze-drying, etc., and collected in the form of crystal.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

昭 63 - 20519

⑬ Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号	⑭ 公告 昭和63年(1988) 4月27日
C 12 P 21/02		6712-4B	
// A 01 N 63/02		7144-4H	
C 07 K 7/06		8318-4H	
(C 12 P 21/02			
C 12 R 1:125)			
C 07 K 99:00		8318-4H	発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 植物病原菌胞子発芽抑制因子の製造方法

⑯ 特 願 昭60-130338

⑰ 公 開 昭61-289898

⑱ 出 願 昭60(1985) 6月14日

⑲ 昭61(1986)12月19日

⑳ 発 明 者 畑 田 清 隆 宮城県仙台市角五郎2-15番2-405  
 ㉑ 発 明 者 浅 野 隆 宮城県仙台市木町5の24  
 ㉒ 発 明 者 伊 東 祥 太 宮城県仙台市中江2-15-1-108  
 ㉓ 発 明 者 斉 藤 功 夫 宮城県仙台市東宮城野4-2-806  
 ㉔ 発 明 者 後 藤 富 雄 宮城県塩釜市藤倉三丁目17-26  
 ㉕ 発 明 者 生 島 豊 宮城県仙台市水の森1-3-26  
 ㉖ 発 明 者 生 井 恒 雄 宮城県仙台市鉤取2丁目23番31号  
 ㉗ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号  
 ㉘ 指定代理人 工業技術院 東北工業技術試験所長  
 審 査 官 小 沢 誠 次  
 微生物の受託番号 FERM P-7661

1

2

## ㉙ 特許請求の範囲

1 バチルス・ズブチリス No. NA-apb-1 株 (Bacillus subtilis No. NA-apb-1 株) を栄養倍地で好氣的に培養し、その培養物中に植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチユリン-A系物質を生成蓄積させ、これを採取することを特徴とする植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチユリン-Aの製造方法。

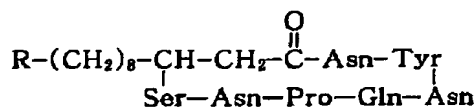
## 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、植物病原菌の胞子発芽抑制作用及び発芽管伸長抑制作用を有し、それによつて望ましくない植物病の予防及び治療を行うのに有用な、胞子発芽抑制因子アイチユリン-A (Iturin-A) を効率よく製造するための新規な方法に関するものである。

## 従来の方法

アイチユリン-Aは、バチルス属に属するある種の土壌菌の培養菌から分離された一般式



5 (式中のRはアルキル基である)

で示される化学構造を有する公知の物質で、抗菌活性作用のあることが知られている。〔文献、(Akira Isogai, Seiji Takayama, Shigeo Murakoshi and Akinori Suzuki, 10 Tetrahedron Letters, Vol23, No. 30.(1982) pp3065 - 3068): (Francise Peypoux, Micheline Guinand, Geogres Michel, Lucien Delcambe, Bhupesh C. Dad and Edgar Lederer, Biochemistry, Vol17, No. 19(1978) 15 p3992-3996)〕

このアイチユリン-Aはこれまでバチルス属に属する土壌菌の培養液中に生産されることが知られているが、この方法は収率が低く、工業的に行う方法としては不適當であつた。

20 発明が解決しようとする問題点

本発明は、前記のパチルスに属する土壌菌よりも、さらに優れたアイチュリン-A生産能力を有し、短時間かつ高収率でアイチュリン-Aを生産するバクテリアを用いてアイチュリン-Aの工業的製法として好適な製造方法を提供することを目的とするものである。

#### 問題点を解決するための手段

本発明者らは、植物病原菌胞子発芽抑制因子の検索のため、その胞子発芽を指標とし、胞子発芽抑制因子の生産性の優れた微生物を見い出すために広範囲にわたる検索を行ったところ、意外にもイネ葉上から分離されたバクテリアの培養液中に、著量のアイチュリン-Aを生産することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。すなわち、本発明に従えば、パチルス・ズブチリス *NaNA-apb-1* 株（微工研菌寄7661号）を栄養培地で好気的に培養し、その培養液中に植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチュリン-Aを生成蓄積させたのち、これを採取することにより、アイチュリン-Aを効率よく製造することができる。

本発明方法で使用されるパチルス・ズブチリス種 (*Bacillus subtilis*) に属する植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチュリン-A生産菌は、宮城県仙台市内で栽培されているイネ葉から分離されたもので、以下に示す菌学的性質を有するものである。

#### (a) 形態

- (1) 細菌の形：桿状
- (2) 細菌大きさ：0.8~3.5 $\mu$ m
- (3) 多形成：なし
- (4) 運動性：あり、側鞭毛を有する
- (5) 胞子：あり、
- (6) グラム染色性：陽性
- (7) 抗酸性：なし

#### (b) 生育状態

28℃で培養し、7日間にわたって観察した。

- (1) 肉汁寒天平板培養：多量生育、2日後、1.0~2.0 $\mu$ m 不規則円形、色彩はクリーム色、可溶性色素は生成しない。
- (2) 肉汁寒天斜面培養：表面に生育し、不透明、乳白色後やや黄味。
- (3) 肉汁液体培養：多量生育し、濁り後沈殿する、橙色を呈す。

(4) リトマス・ミルク：ペプトン化し pH はややアルカリ性を示す。

(5) 生育の範囲：pH 6~8

#### (c) 生理学的性質

- (1) 硝酸塩の還元：陽性
- (2) VPテスト：陽性
- (3) インドールの生成：陽性
- (4) デンプンの加水分解：陽性
- (5) クエン酸の利用：陽性
- (6) プロピオン酸の利用：陰性
- (7) 7%NaCl培地：生育
- (8) アジド培地：生育せず
- (9) 色素の生産（肉汁寒天培地に1%のブドウ糖及びチロシンを加え色素の生産を調べた）：陰性
- (10) カゼイン分解：分解する
- (11) カタラーゼ：陽性
- (12) 嫌気培養：陰性
- (13) 卵黄反応：陰性
- (14) チロシンの分解：分解せず
- (15) ゼラチンの液化：溶解
- (16) リゾチーム抵抗性試験：陽性
- (17) 馬尿酸塩の分解：陰性
- (18) オキシダーゼテスト：陰性
- (19) OFテスト：酸化
- (20) MRテスト：陰性
- (21) 炭酸源より酸の生成
  - グルコース：陽性
  - アラビノース：陽性
  - キシロース：陽性
  - マニトール：陽性
  - マンノース：陽性
  - ソルビット：陽性
  - イニシット：陽性
  - トレハロース：陽性
  - フルクトース：陽性
  - グリセリン：陽性
  - 可溶性デンプン：陽性
  - サツカロース：陽性
  - 麦芽糖：陽性
  - ガラクトース：陽性
  - 乳糖：陽性

(c) サバロウド、デキストロース培地、(デیفコ製)：生育

以上の諸性質をバージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第8版、1974年の記載と比較すると本菌株は好気性のグラム陽性桿菌で側鞭毛による運動性を有することからバチルス (Bacillus) 属に属するものと判断される。バチルス属の中でも馬尿酸塩の分解、生育温度、炭素源の利用性などの特徴から、バチルス・ズブチリスの一菌株と同定し、バチルス・ズブチリス No. NA-apb-1 (Bacillus subtilis No. NA-apb-1) と命名し工業技術院微生物工業技術研究所に微生物受託番号微工研菌寄7661号 (昭和59年6月11日付) として寄託した。

本発明の植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチュリンーAを製造する方法における培養は前記菌株が利用可能な栄養物を含有する培地で行われる。培地組成としては、例えば、じやが芋煎汁、デンプン、グリセリン、デキストリン、シヨ糖、麦芽糖、ブドウ糖などの炭素源、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、コーン・スターチ・リカー、グルテンミール、無機窒素源などが用いられる。また必要に応じて炭酸カルシウム、磷酸二水素カリウム、磷酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、塩化ナトリウム等の無機塩が添加される。培地温度は20~30℃が適当である。種培養は固体培養でも液体培養でもよい。本培養の場合はかき混ぜ培養、振蕩培養、通気培養が用いられる。培養または培養滅菌中消泡を必要とするときはシリコンオイル、界面活性剤などの消泡剤が使用できる。本発明で得られるアイチュリンーAの植物病原菌胞子発芽抑制効果は以下の方法により検定できる。すなわち、供試病菌胞子を所定の濃度に懸濁させ、病菌胞子発芽抑制因子の含有される培養液と胞子懸濁液を混合し、24度、24時間インキュベートせしめ、検体をメチレンブルーで染色し、発芽率を求めることにより、アイチュリンーAの効果を判定できる (文献、池川信夫等、生理活性物質のバイオアッセイ (講談社サイエンティフィック) (1984年))

培養はアイチュリンーAが実質的に蓄積されるまで続け、本物質の培養液からの抽出は、生成したアイチュリンーAは主に培養濾液中に存在するので、遠心分離、または濾過により菌体を除去し

た後、その上清液から精製、採取される。同抑制因子を精製、採取するには通常微生物の代謝産物を採取するのに用いられる手段を適宜利用することができ、例えば減圧濃縮、凍結乾燥、溶媒抽出、樹脂による処理、吸着剤による処理、結晶化、再結晶などの手段を単独、あるいは任意の順序に組み合わせ、または反復して濾液から目的物質の分離、精製、採取を行う。

採取のための好適な実施態様においては、培養終了後、培養液を濾過補助材を用いて濾過し、菌体を除去する。得られた濾液を減圧下で濃縮し、有機溶媒例えば酢酸エチル、ヘキサン、クロロホルム、アセトンなどを添加して目的外物を抽出除去する。ここで得られた残留物をアルコールで抽出し、抽出物を減圧下で濃縮し、例えばシリカゲルのような吸着剤を用いたクロマトグラフィーにかける。吸着剤としてシリカゲルを用いた場合には、溶出溶媒に、ブタノール、エタノール、クロロホルム、アンモニア水、水などの混合溶媒を用いて展開溶出する。溶出液を適宜分画し目的物質を含む画分を集め減圧下低温で濃縮乾固して粗物質を得る。得られた粗物質を更に精製するため上記の手段を適当に組み合わせて、使用することにより、目的物質が培養液から単離される。

#### 25 発明効果

本発明によると、植物病の予防や治療に有効な植物病原菌胞子発芽抑制因子アイチュリンーAを、効率よく製造することができるので、本発明方法はアイチュリンーの工業的製法として好適である。

#### 実施例

次に実施例により本発明を更に詳細に説明する。

#### 実施例

35 肉エキス、ペプトン1%、酵母エキス0.25%、塩化ナトリウム0.5%を含む液体培地に、バチルス・ズブチリスNo. NA-apb-1株を接種し、28度において50時間好氣的に培養した。得られた培養濾液 (30リットル) を減圧下低温で濃縮し、酢酸エチル、洗浄後、メタノールで抽出した。抽出液を減圧低温で濃縮乾固し、同物質をシリカゲル (ODS) カラムクロマトグラフィー、展開溶媒60~80%メタノールで溶出し抑制因子含有、初流液2.5リットルを採取した。この溶出液を濃縮乾固

(4)

特公 昭 63-20519

7

8

し、同操作を3回繰り返すことによつて白色粉末  
のアイチユリン-Aを270ミリグラム得た。この

ものは、別途得た標品と完全に一致した。